

Über die Zersetzung des Leims durch anaërobe Spaltpilze

von

Leon Selitrenny.

Aus dem Laboratorium des Prof. Nencki in Bern.

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. December 1889.)

Die in Nachfolgendem zu beschreibenden Untersuchungen sind die Fortsetzung derjenigen, welche Nencki kürzlich im XCVIII. Bande dieser Berichte „Über die Zersetzung des Eiweisses durch anaërobe Spaltpilze“ veröffentlichte und haben zum Gegenstande die durch die gleichen Mikroben und unter gleichen Bedingungen aus Leim gebildeten Producte. Bei der Gährung des Eiweisses wurden von Nencki aus der aromatischen Reihe nur die drei folgenden Säuren, nämlich die Phenylpropionsäure, die Paraoxyphenylpropionsäure und die Skatol-essigsäure erhalten. Auf Grund dessen nimmt Nencki an, dass in dem Eiweissmolekül drei aromatische Gruppen, und zwar die Phenylamidopropionsäure, das Tyrosin und die Skatol-amidoessigsäure präformirt sind. Bei der anaërobiotischen Gährung des Eiweisses, wo die Oxydation durch den atmosphärischen Sauerstoff ausgeschlossen ist, findet nur durch den nascirenden Wasserstoff die Umwandlung der drei im Eiweissmolekül enthaltenen Amidosäuren in Ammoniak und die respective stickstofffreie Säure statt. Je nach der Pilzart und Luftzutritt lässt sich aus diesen drei Amidosäuren die Entstehung der sämtlichen aus Eiweiss erhaltenen aromatischen Substanzen auf die einfachste Weise erklären. Aus den früheren Arbeiten

ist bekannt, dass Leim, mit hydrolytischen Agentien behandelt, kein Tyrosin und ebenso bei der Gährung weder Phenol, noch Indol oder Skatol gibt. Dass trotzdem in dem Leimmolekül ein aromatischer Kern enthalten sein muss, hat neuerdings Maly¹ gezeigt, indem er bei der Oxydation reinsten Gelatine mit Kaliumpermanganat in der Kälte und nachheriger Behandlung mit Baryt, Benzoësäure erhielt. Wie übrigens Maly bemerkt, ist der Fund nicht neu, denn schon A. Schlieper und G. Guckelberger haben Benzoësäure und Benzaldehyd aus Leim bei der Oxydation erhalten. Schultze² zersetzte circa 1 kg Leim (reinste Gelatine des Handels) durch Erhitzen mit Salzsäure unter Zinnchlorür-zusatz. Es gelang ihm aber nicht, aus den Fractionen des erhaltenen Rohleucins, die mit Kaliumbichromat die relativ grösste Menge Benzoësäure lieferten, die gesuchte Phenylamidopropionsäure zu isoliren. Er betrachtet es als möglich, dass bei der Zersetzung des Leims etwas von dieser Säure entsteht. „Jedenfalls“, sagt Schultze, „ist die Menge derselben sehr gering und man müsste, um sie gewinnen zu können, ohne Zweifel eine grosse Quantität Rohmaterial in Arbeit nehmen.“

Die Thatsache, dass bei der anaërobiotischen Gährung die aus dem Eiweiss abgespaltene Phenylamidopropionsäure zu phenylpropionsaurem Ammoniak reducirt und nicht weiter verändert wird, berechnigte zu der Annahme, dass bei der Vergährung des Leims durch eine anaërobiotische Spaltpilzart in den Äther-extracten der vergährten Lösung die Phenylpropionsäure sich vorfinden wird. Von den von Nencki untersuchten Spaltpilzarten schien der *Bac. liquefaciens magnus* der geeignetste dazu zu sein, da er Nährgelatine rasch verflüssigte, auch wenn dieselbe kein Pepton enthielt und aus naheliegenden Gründen ich in meinen Versuchen gerade den Zusatz der letzteren Substanz vermeiden musste. Die Anordnung des Versuches war folgende:

800 g reinsten Gelatine des Handels, Marke Gold extra, wurden in 16 l Wasser gelöst, in zwei grosse Kolben vertheilt und sterilisirt. Die sterilen Lösungen wurden mit Sporen des *Bac. liquefaciens magnus* inficirt, die Luft aus den Kolben durch

¹ Diese Berichte, Bd. XLVIII, Abth. II, Jänner 1889.

² Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. 9, S. 121; 1885.

Kohlensäure, wie in den Nencki'schen Versuchen, verdrängt und bei Bruttemperatur stehen gelassen. Schon am dritten Tage stellte sich Gährung ein, kenntlich durch Trübung und Gasentwicklung. Der Inhalt des ersten Kolbens wurde am 22. Tage, der des zweiten am 32ten, und zwar in folgender Weise verarbeitet.

Die trübe, nach Methylmercaptan riechende Lösung, welche an Mikroorganismen nur die beweglichen Bacillen und ihre Sporen enthielt, wurde in grosse Retorten gebracht, mit krystallisirter Oxalsäure (auf je 1 l der Lösung 15 g der Säure) versetzt und destillirt. Die anfangs entweichenden Gase passirten eine drei-procentige Cyanquecksilberlösung, wodurch neben Schwefelwasserstoff das Methylmercaptan zurückgehalten wurde. Aus dem Quecksilberniederschlage erhielt ich im ersten Versuche 0·039 g des reinen Bleisalzes, das bei der Bleibestimmung 0·0399 g SO_4Pb oder 68·97% Blei ergab. Die Formel $(\text{CH}_3\cdot\text{S})_2\text{Pb}$ verlangt 68·7% Pb. In dem Destillate, das die flüchtigen Fettsäuren enthielt, war weder Indol, noch Skatol oder Phenol nachweisbar. Genau das gleiche Verhalten zeigte das Destillat der zweiten, am 32. Tage verarbeiteten Portion, nur war hier die Menge des erhaltenen Methylmercaptans noch geringer, indem offenbar sich dieses Gas bei längerem Stehen nach vollendeter Gährung verflüchtigt.

Nach Abdestilliren der flüchtigen Fettsäuren wurde der Retortenrückstand der beiden Portionen auf dem Wasserbade zum Syrup verdampft und hierauf mehrfach mit Äther ausgeschüttelt. Nach Abdestilliren des Äthers hinterblieb auch hier, wie beim Eiweiss, ein gelbliches, in Wasser untersinkendes Öl, nur in erheblich geringerer Menge. Einige Tropfen des Öls wurden in der Wärme in verdünnter Essigsäure gelöst und die klar filtrirte Lösung einerseits mit salpetrigsaurem Kali auf die Skatol-essig- oder carbonsäure, anderseits die zweite Probe mit Millon'schem Reagens auf Oxysäuren geprüft. Die erste Probe fiel negativ aus. Ich erhielt nicht die geringste Fällung einer Nitrosoverbindung, dagegen gab die Millon'sche Lösung eine deutliche Rothfärbung. Es wurde daher das gesammte Öl mit etwas Wasser in einen Kolben gebracht und im Dampfströme so lange destillirt, bis das Destillat nur schwach sauer reagirte. Die vereinten

Destillate wurden mit Soda neutralisirt, zur Trockene verdunstet, der Rückstand mit 30% Schwefelsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Nach Abdestilliren des Äthers hinterblieb ein röthlich gefärbtes, in Wasser untersinkendes Öl. Da das Öl nach zweitägigem Stehen unter Wasser nicht krystallisirte, so wurde es durch Zusatz von Alkohol gelöst und mit Zinkoxydhydrat gekocht. Aus der heiss filtrirten Lösung schieden sich sofort perlmutterglänzende Blättchen des Zinksalzes aus, das abfiltrirt, zwischen Fliesspapier getrocknet und noch einmal aus verdünntem Alkohol umkrystallisirt, sich als phenylpropionsaures Zink herausstellte. Das Salz war stickstofffrei und ergab bei den Elementaranalysen folgende Zahlen:

- 4·2702 g des lufttrockenen Salzes verloren im Exsiccator über SO_4H_2 bis zu constantem Gewichte getrocknet 0·4005 g an Gewicht = 9·37%. Die Formel $(\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_2)_2\text{Zn} + 2\text{H}_2\text{O}$ verlangt für Krystallwasser einen Gewichtsverlust von 9·02%.
- 0·2700 g des über SO_4H_2 getrockneten Salzes gaben 0·5868 g CO_2 , 0·1245 g H_2O und hinterliessen im Schiffchen 0·0590 g ZnO , oder in Procenten: 59·27% C, 5·21% H und 21·5% ZnO .
- 0·3639 g der Substanz gaben 0·7924 g CO_2 = 59·38% C und 0·1697 g H_2O = 5·18% H.
- 0·3617 g des Salzes hinterliessen nach dem Glühen im Porzellan-tiegel 0·0799 g ZnO = 22·09% ZnO .

	Gefunden		Berechnet für phenylpropion- saures Zn = $(\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_2)_2\text{Zn}$
	I	II	
C	59·27%	59·38%	59·50%
H	5·12	5·18	4·95
ZnO	21·85	22·09	22·31.

Der bei der Destillation im Dampfströme nicht verflüchtigte, bräunlich gefärbte Antheil des Öles wurde in heissem Wasser gelöst, filtrirt und das Filtrat in Eiswasser stehen gelassen. Da auch nach zweitägigem Stehen keine Krystallisation erfolgte, so wurde auch diese Lösung mit Zinkoxydhydrat gekocht und

daraus ein Zinksalz gewonnen, das vollkommen das Aussehen des phenylpropionsauren Zinks hatte und nur etwas bräunlich gefärbt war. Durch wiederholtes Umkrystallisiren aus verdünntem Alkohol wurde das Salz rein erhalten und mit Salzsäure zerlegt. Beim Abkühlen der Lösung in Eiswasser krystallisirte daraus die Phenylpropionsäure aus, welche zwischen Fliesspapier abgepresst und im Exsiccator getrocknet bei 47° schmolz. Da die Mutterlaugen dieses Salzes mit Millon'schem Reagens sich noch immer roth färbten, so wurden sie nach Entfernung des Zinkes auf möglichst kleines Volumen eingedampft. Beim Stehen in der Kälte schied sich hieraus ein Öltröpfchen, aber keine Krystalle aus. Der nicht verflüchtigte geringere Antheil des Öles war also ebenfalls Phenylpropionsäure, und die Rothfärbung mit Millon'schem Reagens, welche Spuren einer aromatischen Oxyverbindung andeutet, ist wohl darauf zurückzuführen, dass auch die reinsten Sorten der Handelsgelatine noch immer geringe Eiweissmengen enthalten. Das Gewicht der erhaltenen Phenylpropionsäure kann ich nicht genau angeben, doch betrug die Gesamtmenge des aus beiden Portionen erhaltenen Zinksalzes etwas über 6 g.

Der nach Abdestilliren der flüchtigen Fettsäuren und nach Extraction der Phenylpropionsäure mit Äther hinterbliebene Retortenrückstand wurde in Wasser gelöst und zur Entfernung der Oxalsäure mit Kalkcarbonat gekocht. Die davon abfiltrirte Lösung, zu Syrupsconsistenz eingedampft, habe ich in einer Flasche mit viel absolutem Alkohol versetzt, tüchtig durchgeschüttelt und zwei Wochen lang in der Kälte stehen gelassen. Es schieden sich während dieser Zeit eine Menge grosser Krystalle aus. Die obere klare Lösung wurde jetzt abgegossen, der Krystallbrei auf ein Filter gebracht, mittelst Saugpumpe abfiltrirt und mehrfach mit Alkohol nachgewaschen. Das Aussehen der Krystalle, ihre Schwerlöslichkeit in Alkohol und süsser Geschmack sprachen dafür, dass Glykocoll vorlag. Die Krystalle wurden daher in Wasser gelöst und mit Kupfercarbonat gekocht. Aus dem heissen Filtrate schied sich die Kupferverbindung in blauen Nadeln ab, welche abfiltrirt und die Mutterlauge davon zur weiteren Krystallisation eingedampft wurde. Im Ganzen erhielt ich so 80·3 g lufttrockenes Kupferglykocollat, entsprechend

6·6% der angewandten Gelatine. Die Reinheit der erhaltenen Verbindung geht aus folgender Kupferbestimmung hervor:

0·4428 g des bei 110° getrockneten Kupfersalzes, im Porcellantiegel gegläht, hinterliessen 0·1648 g CuO = 37·22% CuO. Die Formel $(C_2H_4NO_2)_2Cu$ verlangt 37·44% CuO.

Das Filtrat von ausgeschiedenem Glykocoll wurde zunächst zur Entfernung des Alkohols destillirt und hierauf auf dem Wasserbade bis zum Syrup verdunstet. Ausser etwas Leucin in den charakteristischen Kugelformen erhielt ich aus dieser Lauge keine Krystalle mehr. Die syrupige Masse, hauptsächlich aus Leimpeptonen bestehend, wurde daher von neuem in Wasser gelöst und mit wässriger Sublimatlösung so lange versetzt, als noch Niederschlag entstand. Der abfiltrirte und mit Wasser ausgewaschene Quecksilberniederschlag wurde in Wasser suspendirt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat von Quecksilbersulfid, auf dem Wasserbade verdunstet, hinterliess einen geringen, krystallinischen, stickstoffhaltigen Rückstand, der jedoch bei weiteren Versuchen, ihn zu reinigen, derart zusammenschmolz, dass seine Menge für Elementaranalysen nicht mehr ausreichte.

Ich wiederholte den Gährungsversuch noch einmal, und zwar unter gleichen Bedingungen und mit der gleichen Menge Gelatine. Nur wurde die Lösung statt mit dem *Bac. liquefaciens magnus*, mit den Sporen der Rauschbrandbacillen inficirt. Es ereignete sich hier der Unfall, dass gleich in den ersten Tagen des Versuches durch Auslöschten der Lampe unter dem Thermostaten Luft in die beiden Kolben eindrang und damit auch die Nährlösung mit fremden Organismen inficirt wurde. Die Zersetzung war hier lange nicht so energisch, wie im ersten Versuche, wenn man aus der geringen Trübung der Flüssigkeit und schwachen Gasentwicklung darauf schliessen darf. Der Inhalt der Kolben wurde nach vier, respective fünf Wochen untersucht und zunächst constatirt, dass die Flüssigkeit verschiedene Mikroben enthielt, da ausser den von einander schwer zu unterscheidenden beweglichen Stäbchen auch Mikrokoken vorhanden waren. Die Flüssigkeit wurde genau wie im vorigen Versuche verarbeitet; auch hier erhielt ich unter den flüchtigen Producten weder Phenol, noch Indol, noch Skatol. Das Destillat enthielt ausser Methyl-

mercaptan nur noch die flüchtigen Fettsäuren. Eine auffallende Verschiedenheit zeigte dagegen der Ätherextract, der die aromatischen Säuren enthalten sollte. Nach Abdestilliren des Äthers hinterblieb auch hier ein röthliches, in Wasser untersinkendes Öl, das ebenso wie im ersten Versuche keine Skatolessigsäure enthielt und mit Millon'schem Reagens sich roth färbte; das aber, wie die Analyse zeigte, nicht allein Phenylpropionsäure, sondern auch, und zwar vorwiegend, Phenylelessigsäure enthielt. Auch hier wurden die öligen Säuren im Dampfströme destillirt, wobei, wie ich zum voraus bemerken will, aus dem nicht verflüchtigten Antheile keine Oxysäure isolirt werden konnte. Die im Dampfströme mit übergegangene Säure wurde in das Zinksalz verwandelt und nach wiederholter Krystallisation dasselbe analysirt.

0·2048 g des über SO_4H_2 bis zu constantem Gewicht getrockneten Salzes gaben 0·4316 g CO_2 , 0·0871 g H_2O und 0·0463 g ZnO .

	Gefunden	Berechnet für	
		$(\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_2)_2\text{Zn}$	$(\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2)_2\text{Zn}$
C	57·47%	59·50%	57·31%
H	4·72	4·95	4·18
ZnO . . .	22·60	22·31	24·17.

Wie man sieht, zeigen die analytischen Zahlen, dass ein Gemisch von phenylpropionsaurem und phenylelessigaurem Zink vorlag. Um hierüber Gewissheit zu haben, respective die beiden Säuren zu trennen, wurde der Rest des Zinksalzes, wovon ich in diesem Versuche im Ganzen 4 g erhielt, in wenig Wasser suspendirt und mit Salzsäure bis zur völligen Zersetzung der Zinksalze in einem Probir Röhrchen auf dem Wasserbade erwärmt. Beim Abkühlen der ölig abgeschiedenen Säure erstarrte dieselbe krystallinisch und wurde zunächst zur Entfernung des anhaftenden Öles auf Fliesspapier gebracht. Die zurückgebliebenen Krystalle, aus heissem Wasser umkrystallisirt und im Exsiccator getrocknet, schmolzen genau bei 75° , dem Schmelzpunkte reiner Phenylelessigsäure.

Aus dem mit Äther extrahirten Rückstande erhielt ich auch in diesem Versuche Glykocoll, nur in etwas geringerer Menge-

Das Hauptumwandlungsproduct des Leims, hier, wie in dem ersten Versuche, war das zähe, syrupige, in Weingeist lösliche, in absolutem Alkohol unlösliche Leimpepton. Nencki und Sieber¹ erhielten bei der Oxydation verschiedener Eiweissstoffe mit starker Salpetersäure Paranitrobenzoësäure, welche offenbar ein Umwandlungsproduct der in den Eiweissstoffen präformirten Phenylamidopropionsäure ist. Um zu sehen, ob das Leimpepton noch Phenylamidopropionsäure enthalte, habe ich 400 cm^3 des syrupigen Peptons, dessen Gewicht 750 g betrug, in Portionen zu je 100 cm^3 mit dem vierfachen Gewichte rauchender Salpetersäure oxydirt. Nach vollendeter heftiger Einwirkung wurde die Flüssigkeit zur Entfernung der Salpetersäure auf dem Wasserbade bis zur Syrupconsistenz eingedampft, sodann mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und mit Äther extrahirt. Nach Abdestilliren des Äthers hinterblieben gelb gefärbte Krystallnadeln, die aus heissem Wasser unter Zusatz von Thierkohle umkrystallisirt wurden. Die Menge der im Exsiccator getrockneten Krystalle betrug ungefähr 2 g . Ihr Schmelzpunkt lag bei 180°, was Bernsteinsäure vermuthen liess. Eine Probe der Substanz, mit Ammoniak neutralisirt, gab mit Eisenchlorid den charakteristischen Niederschlag von bernsteinsaurem Eisenoxyd und die Elementaranalyse bestätigte die Vermuthung.

0·245 g der Substanz gaben 0·3635 g CO_2 oder 40·31% C und 0·1177 g H_2O = 5·31% H. Die Formel $C_4H_6O_4$ verlangt 40·67% C und 5·08% H.

Paranitrobenzoësäure habe ich also hier nicht erhalten, welcher Umstand dafür sprechen würde, dass bei der Gährung des Leims die im Moleküle vorhandene aromatische Gruppe vollkommen abgespalten wurde. Wie unzulässig dieser Schluss aber ist, das zeigt der zweite Oxydationsversuch, wobei ich nicht Salpetersäure, sondern Kaliumpermanganat angewendet habe. 200 g auf dem Wasserbade möglichst concentrirte Leimpeptone wurden in 6 l Wasser gelöst und mit 1200 g Kaliumpermanganat in der Wärme (auf dem Wasserbade) oxydirt. Nach vollkommener Entfärbung wurde die Lösung heiss filtrirt, der Braunsteinschleim mit mehreren Litern siedenden Wassers auf dem Filter aus-

¹ Berl. chem. Ber. 1885, S. 394.

gewaschen, das Filtrat sammt Waschwasser auf möglichst kleines Volumen eingedampft und über Nacht stehen gelassen. Nach Abfiltriren der in der Zeit ausgeschiedenen Oxalsäure wurde die Lösung mit Salzsäure angesäuert und mit viel Äther extrahirt. Nach Abdestilliren des Äthers hinterblieben Krystalle, deren Gewicht nach dem Trocknen im Exsiccator etwas über 1 g betrug. Die Krystalle wurden in Wasser gelöst, mit Kalkcarbonat gekocht und die davon abfiltrirte Lösung auf ein kleines Volumen eingedampft. Nach einigen Stunden schieden sich Krystalle aus, welche abfiltrirt, abgepresst und hierauf in wenig heissem Wasser gelöst und mit Salzsäure zersetzt wurden. Beim Erkalten erstarrte die Probe krystallinisch und die abfiltrirten Krystalle erwiesen sich als reine, bei 121° schmelzende Benzoëssäure.

Der nach dem Kochen des Ätherauszuges mit Kalkcarbonat in Wasser unlösliche Rückstand wurde mit Salzsäure zersetzt und mit Alkoholäther (2 Theile absoluter Alkohol und 1 Theil Äther) extrahirt. Nach Abdestilliren der Ätheralkohollösung hinterblieb ein geringer Rückstand, der aus Wasser umkrystallisirt und über SO_4H_2 getrocknet, im Capillarröhrchen bei 180° schmolz und in neutraler Lösung durch Eisenchlorid roth gefällt wurde, also Bernsteinsäure war.

Aus 800 g lufttrockener Gelatine erhielt ich gegen 6 g Phenylpropionsäure. Zieht man aber den Umstand in Betracht, dass schon beim Abdestilliren der flüchtigen Fettsäuren ein Theil der Phenylpropionsäure sich verflüchtigt und berücksichtigt die bei der Isolirung und Reinigung unvermeidlichen Verluste, so ist man wohl zu der Annahme berechtigt, dass aus dem Leim etwa 1% Phenylamidopropionsäure entstanden ist. Bei der Vergährung des Leims ist vielleicht die Hälfte desselben in krystalloide Producte, die andere in Pepton verwandelt worden. Man kann daher wohl annehmen, dass bei der völligen Spaltung des Leims in nur krystalloide Producte 2—3% Phenylamidopropionsäure erhalten werden können.

Dass diese Säure die Muttersubstanz der von früheren Autoren bei der Oxydation des Leims erhaltenen Benzoëssäure ist, brauche ich nicht besonders hervorzuheben. Da ich weder Paraoxyphenylpropionsäure, noch Skatolessigsäure oder deren Derivate erhielt, so liegt in dem Mangel der beiden letzten

aromatischen Producte ein wesentlicher Unterschied zwischen den eigentlichen Eiweissstoffen und Leim. Ein weiterer Unterschied zwischen Eiweiss und Leim wird ferner durch die relativen Mengen der Amidosäuren der Fettreihe im Molekül bedingt. So erhielt Nencki¹ bei der Gährung des Leims über 12% Glykocoll, welche grosse Menge dieser Amidosäure nie aus den eigentlichen Eiweissstoffen erhalten wurde.

¹ Über die Zersetzung des Eiweisses und der Gelatine bei der Fäulniss mit Pankreas. Bern 1876, S. 11.